應用於健康種苗繁殖之生物技術

張清安
行政院農委會農業試驗所植病系

摘　　要

應用健康種苗以減輕作物栽培過程中病蟲害之損失，降低農藥等化學藥劑之使用，乃永續農業經營中極重要之環節，因此如何永續生產足量之健康種苗以供應所需，遂成爲發展永續農業中重要之工作項目。不同之作物種類面臨不同之病蟲害威脅，因此生產各種作物之健康種苗首先必須對種苗所可能攜帶之病原種類及其特性特性能完全掌握，其次則必須針對各種病原發展出精確、敏感及快速有效率之專一性檢定方法，以便能在種苗生產過程中隨時監控，確保種苗之無病狀態，同時也提供種苗消費者或超然之第三者得以認證種苗之品質，避免產銷之爭議。因此病原之偵測檢定技術乃發展任何一項作物之健康種苗生產體系之關鍵，缺少此項關鍵技術，將無從認定任何作物種苗之健康程度。一般而言經由種苗所攜帶傳播之病原種類以病毒及細菌之例子最多，此類病原大多造成其寄主作物之系統性感染，因此會隨無性繁殖方式而傳播至後代種苗，傳統上偵測或檢定此類病原一向以免疫抗體反應法爲技術之主幹，由最早期之載玻片沈澱法一直演進發展到現階段頗爲精密之酵素連結抗體法(ELISA)。報告指出 ELISA 之偵測敏感度可以達到 10-100 ng/ml 之程度，對於一般病原而言，此種敏感度事實上已足夠應付健康種苗生產所需。然而近年來部分作物在發展健康種苗快速生產之過程中大量應用無菌組織培養技術，資料顯示部分病原在人工培養環境下於寄主體內之濃度常遠低於自然生長狀態下者，此狀況造成應用傳統之免疫抗體反應法無法順利將病原偵測出來，此種病原漏檢之情況成爲部分作物健康種苗生產過程中之死角。爲克服此種由於病原濃度低於偵測法敏感度範圍之困難，研究人員已開始應用近年來所蓬勃發展之生物技術，尤其是核酸偵測技術於健康種苗生產中病原之偵測上，事實上已證明部分生物技術確實具有突破上述障礙，敏感度高於免疫抗體法而順利將病原測出之可能。例如核酸探針雜配法(DNA probe hybridization)及近年來極爲廣泛流行之聚合脢連鎖

反應法(polymerase chain reaction)均具備此種特質。當然這些生物技術檢定法之技術門檻較免疫檢定法高出許多，所需之儀器設備與對操作人員之素質要求較高，過程中一般耗材與花費也較多，因此應用在產業上大量樣本之例行篩檢時，由於所費不貲，較難被第一線之業者接受，此乃這些技術有待研究人員進一步發展突破之地方。唯有更降低成本，簡化操作程序，方能爲產業界全面接受應用。另外生物技術除了可以直接應用於病原之偵測外，近年來亦已應用於改進植物病毒偵測用抗體之生產效率或突破生產障礙上。過去傳統上病毒抗體之製備，一向以純化之病毒顆粒或經電泳回收之鞘蛋白爲免疫原，注射於動物體內刺激其產生免疫反應後取得，因此抗體品質之優劣決定於所注射之免疫原之純度。然而對於不易單獨分離及純化之病毒種類，其抗血清之製備便極爲困難。目前利用分子生物技術，選殖病毒的全長度鞘蛋白基因，構築於表達載體上(expression vector)，利用其寄主細菌之培養，即可大量生產鞘蛋白作爲免疫原，進行抗血清之製作。目前已有多數成功之例子，本實驗室也已將此技術應用在百合、夜來香、金花石蒜及彩色海芋之多種重要病毒之抗體試劑生產上，且證實所生產出之抗體試劑品質優於傳統生產之抗體。此項技術不僅突破傳統病毒純化之障礙與瓶頸，更改進了抗體之生產效率，使未來抗體試劑之持續供應將不再成爲限制健康種苗生產之問題，誠爲近年來健康種苗發展上之一項重要利多。

前　　言

本省因地理環境使然，物種繁雜且可全年繁衍不斷。雖可稱爲作物栽培之天堂，卻同時也是病蟲害滋生之樂土。因此植物病害在本省發生普遍而嚴重，早爲各方所共識之事實。某些病原生物例如病毒 (virus)、類病毒 (viroid)、植物菌質體 (phytoplasma)及部分專門入侵維管束輸導系統之細菌(xylem or phloem-limited fastidious bacteria)，當侵入寄主植物後會形成全身系統性感染，由於長期消耗寄主能量以繁衍其個體，因此除造成寄主植物生長與結實之異常外，此類病原均可藉由寄主之無性繁殖方式而傳播至後代種苗 (2)。另外也有部份病原如細菌 (bacteria)與真菌(fungus)也可以在感染之過程中，侵入寄主之種子組織或污染種子之表面，因而隨種子散佈而達到傳播之目的。可以造成系統性感染之病原，透過寄主之無性繁殖，通常可以在後代所有苗木中形成全面之感染，感病種苗栽培

後於生長初期即可顯現病徵，不僅其自身生長減緩與質量低落，且形成病害傳播根源，造成全面流行 (2)。感染或污染種子之病原雖然不會在發芽之幼苗中形成全面之感染，但也可以讓病原生物在部分幼苗中形成初期之傳播根源，造成病害之提早流行，而危及作物之正常生長。針對上述隨種子或種苗傳播之病害，目前較廣為應用之對策即全面栽植已去除特定病原(specific pathogen free)之健康種子或種苗，以取代帶有病原之個體，因此可降低田間作物生長初期之病原密度，甚至可將其完全隔離或消除，如此便可根除病害之發生、延緩或減輕病害之流行 (2)。基本上此種對策會明顯減輕病害發生壓力，因而減少後續栽培過程中應用藥劑或其他化學防治手段之必要性與頻度，如此對於環境之保護與生態之平衡具有正面之影響。本省最早將此對策付諸應用且獲得成功之例子，以水稻種子消毒最為明顯，因為此項工作之全面落實，造成藉由種子傳播而橫行一時之稻苗徒長病，於 60 年代後即逐漸趨於緩和。另外 60 年代初期所執行之馬鈴薯健康種薯繁殖制度，推行至今已愈 26 年，其防治成效亦為各方所肯定 (2)。爾後本省陸續針對柑橘、香蕉、百香果、綠竹筍、豇豆、文心蘭、海芋等作物發展健康種苗生產供應制度，亦普遍獲得預期之防治成果。在發展各種作物健康種苗生產體系之過程中，除了必須完全掌握各種作物種苗所可能攜帶之病原菌種類及其傳播特性外，另一個要件則是必須針對各種病原發展出精確、敏感及快速有效率之專一性檢定法，以便能在種苗生產過程中隨時監控，確保種苗之健康狀態 (1)。過去數十年間最被普遍應用之病原檢定技術是抗血清檢定法，例如酵素連結抗體檢測法(ELISA)即是眾所周知且廣泛採行之方法。然而近年來分子生物技術之發展突飛猛進，許多新型病原檢定技術因應而生，其敏感度不僅優於傳統之抗血清檢定技術 (1, 14)，而且部份分子生物技術甚至具有突破傳統科技瓶頸，解決實務性問題之優勢。現階段雖然這些技術礙於成本及操作人才等因素之限制，尚未於產業界全面普及應用，但展望未來此類技術勢將被逐步改良，成為未來進行病原檢定之另一項主流技術。本文乃針對未來具有應用潛力之病原檢定用生物技術，尤其是與去氧核醣核酸相關之技術(DNA-based technology)加以概略介紹，希望能提供給種苗界朋友參考應用。至於前面所提及之抗血清檢定技術將不列入本文討論範圍，有興趣之朋友可參考其他論說資料 (1)。

核酸探針雜配法 (Nucleic acid probe hybridization)

此法乃利用與目標病原之特定核酸片段具有互補性(complimentary)且標定有放射性或非放射性物質的一段核酸片斷做為檢定試劑（科學上習慣稱之為探針 probes），使其與供測病原之核酸試料發生雜配 (Hybridization) 反應 (即二互補核酸片段發生相互結合捕捉現象)，其正反應之結果可以偵測探針上所標定之放射性或非放射性物質作為判定之依據 (1, 14)。目前科學界普遍之共識為，探針雜配法偵測病原之敏感度與專一性均高於傳統之抗血清檢定法，但是此法除了成本較高之問題外，在準備供試試料時因為必須抽取核酸，故程序上較為繁複，遠不如一般抗血清法簡易 (1, 14)。另外在製備探針之技術上也非一般傳統植物病理研究室所能勝任。加上如果使用放射性元素標定探針時，在使用上又有安全性之限制。因此探針雜配法目前大都被應用在專業研究室內，針對少量重要標本進行檢定，其普及性尚不如抗血清檢定法。晚近有些非放射性之標定法被發展出來，包括酵素呈色法及冷化學光法等，早期這些方法仍有背景值偏高及敏感度降低的問題，但最近已經有所改善且已發展成為商業化標定試劑組，對探針雜配法之廣泛應用有顯著之幫助。不過探針雜配法整體上因為技術門檻偏高，且所需花費之人力與物力成本較高，在經濟上之考量下，現階段產業界普遍應用之可能性仍然不大。但在人力物力財力充裕之國家級試驗室內，探針雜配法不失為一項值得選擇之病原檢定法 (1, 14)。

基本上探針雜配法在操作上分為兩種主要方式，一種稱為點漬雜配法(dot blot hybridization)，此法乃將含有檢定對象病原之植物試料經過一個核酸抽取程序，以取得該試料之全量核酸(total nucleic acid)，再將定量(通常是幾個 ul 到數十個 ul) 之核酸試料點滴於 nylon 或 nitrocellulose paper 上令其乾燥後 (此程序稱為點漬)，再進行探針之雜配反應 (14)。市面上有商品化之點漬設備，試料經點漬後可形成特定大小之圓點或其他形狀之點漬，有利於後續之反應結果判斷。另一種方式稱為直接壓碎雜配法(squash hybridization)，為直接將少量供試植物材料置於 nylon 或 nitrocellulose paper 上壓碎，令其汁液為 nylon 或 nitrocellulose 膜所吸收，乾燥後直接與探針進行雜配反應 (14)。此法較前項方式簡便，且可於田間直接進行採樣，再寄回專業實驗室內進行檢定。不過所耗費之吸附膜較多，支出成本較高，且根據實際應用之經驗，此法之敏感度較前項之點漬法為低。

目前探針雜配法已經被應用在多種病原之檢定上，包括細菌、真菌、植物菌質、病毒及類病毒等均有成功應用之紀錄 (7, 10, 14,

20)。

聚合脢連鎖反應檢定法 (Polymerase chain reaction, PCR)

1987 年 Kary Mullis 發展出一種極具強大功能之核酸偵測法，稱爲 Polymerase chain reaction (PCR) (14)。此法乃利用目標核酸片斷之上下游已知核甘酸序列，以人工方法先各合成一段約含 20 個核甘酸的片斷。利用此二片斷當做引子(primer)，在含有核甘酸及耐熱性聚合脢(DNA polymerase)的情況下，以儀器控制不同反應溫度，促使標的核酸序列發生聯鎖複製反應，於短時間內快速增幅放大，爾後再用電泳方式進行分析，根據預期標的核酸序列片段之出現與否，作爲判斷是否有已知之病原感染之依據 (14)。此偵測法之靈敏度是所有已知的檢定法中最高者；據估計高出 ELISA 10^7 倍以上，而比核酸探針雜配法高出 10^4 倍 (14)。但是也由於此一偵測法極端敏感，故操作時稍一不慎有所污染，即可造成假正值 (False positive)之出現而引起誤判，應用時不可不慎。另外，此項技術使用前必需對標的病毒之核酸序列有所了解才能執行，因此對於未知、尙未完全研究透徹或是研究難度較高的病原，便無法立即著手檢查爲其較大之限制。又技術操作時需要有高經驗及素質之人力，優良之實驗室設備及充裕之經費預算，也是 PCR 檢定法全面普及之另一項限制。不過 PCR 自從 1987 年發展自今，許多在病原檢定上被視爲高難度的問題均已突破，其中值得一提的是：

一、利用系統專一性核酸序列引子對(strain specific primer pair)，可以在混亂之病原族群中快速偵測出具有特殊病原性分化之系統 (12, 17, 18)，這方面在傳統病理學技術上，可能需要耗費相當長之接種試驗程序方能達成。

二、利用所謂的屬或種專一性引子對(genus or species specific primer pair)，可以將同屬或同種之不同病原快速加以鑑別 (11, 13)，事實上此種引子對幾乎類似廣效性探針，可以針對特定之病原屬或種進行快速偵測，提供現場人員在確實之病原鑑定完成前，作快速之防治因應對策。

三、可以先利用一套廣效性引子對將分類地位接近之病原之特定核酸片段加以增幅放大，爾後再配合特定限制脢之分解與電泳分析其核酸片段之多形性(RFLP)，亦可以快速分辨這些分類地位接近之病原或系統 (9)。

四、PCR 技術可以被應用於快速合成偵測用之核酸探針，其優點尤

其在不需經過繁複之選殖(cloning)程序，即可快速合成並同時完成標定手續 (6)，大幅提昇使用之方便性。

五、PCR 技術除了在偵測病原上有突破性之發展與應用外，近年來也被廣泛應用於核酸片段之選殖 (15)，加上各種相關技術之突破與生技公司之大力介入，許多相關之組合式試劑均已商業化，因此近年來 PCR 技術已成爲病原核酸選殖之利器 (14)，大幅提昇選殖程序之效率，此項進步也更促成了病原分子生物學之突飛猛進。

總之，在研究人員不斷積極的努力下，PCR 已經被證實具有超強的病毒檢定能力與不可限量的開發潛力。相信許多過去認爲極端困難的目標，在可見的未來必將逐一被突破。PCR 之發展只是一項例證，在人類無止盡的想像空間下，似乎困難的事只是一個過程而已，絕非是必然。

應用細菌表現載體合成特定病原蛋白質供免疫試劑之製備

此項技術在植物病理界中最先被病毒學者應用於病毒檢測用抗體之製備上(16, 19)。傳統上病毒偵測用抗體試劑之製備，一向以直接由寄主植物組織純化所得之病毒顆粒爲免疫原(immunogen)，注射於動物體上以刺激免疫反應，再由血液中純化其產生之抗體。因此抗體試劑品質之優劣，決定於所注射病毒顆粒之純度，純度不佳而含有植物組織成分者，其所得抗體試劑在使用時，會與健康植物成分反應，導致反應背景值過高而容易造成判別上之困擾，此種抗體之應用性便不符需求。因此對於性質不穩定或濃度低而不易純化之病毒種類，其抗體試劑之製備便極爲困難。爲克服此困難，學術界曾試圖以核酸偵測技術取代傳統之抗體檢定，然而檢定核酸過程中，樣品之準備較爲繁鎖，且材料及藥劑價格高昂，尚難普及應用於需要篩檢大量樣品之產業界。另外 80 年代學界也曾一度熱衷於應用融合瘤技術生產病毒之單元抗體 (monoclonal antibody)，雖然此項技術確實可以解決上述抗體生產之瓶頸，但是成功製備一株單元抗體所需之時間、設備、成本與對於目標病毒必須先具備某種程度瞭解之特性，也相對限制了此項技術之普及。近年來由於分子生物技術之突飛猛進，促使學者可以輕易地將目標植物病毒的全長度鞘蛋白基因予以選殖，利用轉型(transformation)技術可以將鞘蛋白基因構築於高效率之表達載體上 (high expression plasmid vector)，使其於 *E. coli* 宿主細菌培養過程中大量合成病毒之鞘蛋白。此種

由細菌所合成之病毒鞘蛋白可以經過簡單之回收純化程序，即能作爲免疫原進行抗體之製備。此項技術不僅克服單元抗體之應用瓶頸，而且在研發上所需成本、設備與時間上均較爲經濟。目前在植物病毒方面，成功的例子已有 CTV (Citrus tristeza virus)(16)、GMV(garlic mosaic virus) 和 GLV (garlic latent virus)(19)等。農業試驗所病毒研究室也已成功將此技術應用在百合、夜來香、金花石蒜及彩色海芋之多種重要花卉作物病毒之抗體試劑生產上，且證實所生產出之抗體試劑品質優於傳統生產之抗體 (3, 4, 5, 8)。

整體而言，此項技術具有下列多項應用上之優點：

一、可以克服部份病毒不易純化之困難，在免除傳統純化過程下，而能製作出高品質之抗體。

二、對於因爲複合感染而無法單獨分離之病毒，經此程序能夠分別獲得對應單一病毒之專一性抗體。

三、對於尚未入侵國內之國際檢疫危險性病毒，可以在不引進活體病毒下製備其抗體，供國內檢疫之用。

四、此項技術可應用于製備尚未完全鑑定之新病毒之抗體試劑，供緊急防疫鑑定處理之用，可大幅節省研發時間，提升對於新入侵病毒防疫反應之效率。

五、經過多方試驗結果證實，經此技術所製備之抗體其反應性與傳統方法所製備者無異，且其背景值更低，應用性較高。

六、此項技術對於感染特殊作物或難以研究之病毒特別有用，譬如多數之花卉作物，其感染病毒之種類通常較少受到傳統病毒學者之注意，故參考資訊極爲有限。或者由於作物種類之特殊，其病毒通常不易經由一般傳統方法獲得免疫抗體試劑，但是此項技術可超越傳統方法，在不需完全掌握病毒特性下即可先做出抗體試劑，供病毒偵測及健康種苗篩選之用。

七、由於鞘蛋白基因已構築於細菌體內，需要時將細菌取出培養即可獲得高量之鞘蛋白，且未來源源不斷供應質量相同之鞘蛋白作爲免疫原，在技術上不成問題，因此將來病毒抗體試劑之免疫原將可成爲商業化試劑，開拓另一項商機。

八、由於此項技術大幅提昇免疫原之製備純度與生產效率，將連帶提升未來抗體試劑之製備效率並顯著降低其成本。

結　語

上述三項分子生物相關之病原檢定技術事實上已經爲現階段國

內各研究單位植物病理實驗室所廣泛應用中。由於成本與操作人才之限制，這些技術尚未普及於國內產業界，尤其生產健康種苗之業界，落實應用此類技術尚有一段距離。不過國際間科技研發之腳步從來不會有停歇之一天，未來顯而易見的將會有更多更具實用性之技術被發展出來，如果我國產業要真正達到國際化之水平，對於這些已經發展成熟之技術應毫無考慮地立即加以引進並實際應用，一則培養本土人才，一則鍛鍊應用經驗，如此才能隨時掌握未來新科技發展先機，提升產業競爭力，否則將與國際科技水平漸行漸遠，甚至完全失去競爭能力，永遠成爲先進科技大國之刀殂。本文僅粗略指出目前應用於健康種苗生產過程中病原檢定用生物技術之一二，由於所學有限，當無法涵蓋所有可能已發展或發展中之技術。僅希望能藉此拙文，引領讀者稍窺未來生物技術在健康種苗產業發展上之潛力，並與所有產業界朋友共勉，期能掌握生物科技發展脈動，成爲未來科技潮流之隨波逐流者，而非旁觀喪氣者。

參考文獻

1. 張清安 1996. 植物病毒鑑定及診斷新技術。p. 35-45. 植物保護新科技研討會專刊。臺灣省農業試驗所特刊第 57 號。臺灣省農業試驗所編印。207 pp.。
2. 張清安 1997. 本省應用無病毒種苗之回顧與展望。植物保護學會刊 39:63-73.
3. 張清安、劉逸琪、陳金枝、鄧汀欽 1997. 百合斑紋病毒鞘蛋白基因之選殖及其在 *Escherichia coli* 之表現。植物病理學會刊 6:215-216.
4. 張清安、陳金枝、鄧汀欽 1998. 本省百合病毒研究及檢定技術發展現況。 p.151-158. 唐菖蒲、百合及菊花研究現況與產業發展研討會專刊。台中區農改場編印。
5. 陳金枝、張清安、江芬蘭、劉逸琪、向培健 1998. 夜來香微嵌紋病毒鞘蛋白基因核甘酸序列分析及其在 Escherichia coli 之表現。植物病理學會刊 7: 226.
6. Akin, A., Wu, C. C., Lin, T. L., Keirs, R. W. 1993. Chemiluminescent detection of infectious bursal disease virus with a PCR-generated non-radiolabeled probe. J. Vet. Diagn. Invest. 5:166-173.
7. Bijaisoradat, M., and Kuhn, C. W. 1988. Detection of two viruses

in peanut seeds by complementary DNA hybridization tests. Plant Dis. 72:956-959.

8. Chang, C. A., Chen, C. C., Deng, T. C., and Liu, Y. C. 1998. Production of antiserum against lily mottle potyvirus by immunizing bacteria expressed cloned viral coat protein. Plant Path. Bull. 8:225.
9. Dekker, E. L., Derks, A. F. L. M., Asjes, C. J., Lemmers, M. E. C., Bol, J. F., and Langeveld, S. A. 1993. Characterization of potyviruses from tulip and lily which cause tulip breaking. J. of Gen. Virol. 74:881-887.
10. Frenkel, M. J., Jilka, J. M., Shukla, D. D., and Ward, C. W. 1992. Differentiation of potyviruses and their strains by hybridization with the 3' non-coding region of the viral genome. J. of Virol. Methods 36:51-62.
11. Karasev, A. V., Nikolaeva, O. V., Koonin, E. V., Gumpf, D. J., Garnsey, S. M. 1994. Screening of the closterovirus genome by degenerate primer-mediated polymerase chain reaction. J. Gen. Virol.. 75:1415-1422.
12. Kohnen, P. D., Johansen, E. E., and Hampton, R. O. 1995. Characterization and molecular detection of the P4 pathotype of pea seedborne mosaic potyvirus. Phytopathology 85:789-793.
13. Langeveld, S. A., Dore, J. M., Memelink, J., Derks, A. F. L. M., Vlugt, C. I. M. van der, Asjes, C. J., Bol, J. F. 1991. Identification of potyvirus using the polymerase chain reaction with degenerate primers. J. Gen. Virol. 72:1531-1541.
14. Miller, S. A. 1995. Plant disease diagnosis: Biotechnological approaches. p.461-473. In: Molecular methods in plant pathology. Ed. By Singh R. P. and Singh U. S. CRC Press Inc. London. 523 pp.
15. Nicolas, O., Laliberte, J. F. 1991. The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. J. Virol. Methods. 32:57-66.
16. Nikolaeva, O. V., Karasev, A. V., Gumpf, D. J., Lee, R. F., and Garnsey, S. M. 1995. Production of polyclonal antisera to the coat protein of citrus tristeza virus expressed in Escherichia coli: Application for immunodiagnosis. Phytopathology 85: 691-694.

17. Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D., Gillings, M. R. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. J. Gen. Virol.. 78:2099-2103.
18. Rush, C. M., French, R., Heidel, G. B. 1994. Differentiation of two closely related furoviruses using the polymerase chain reaction. Phytopathology. 84:1366-1369.
19. Tsuneyoshi, T., and Sumi, S. 1996. Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue bloting immunoassays. Phytopathology 86: 253-259.
20. Wetzel, T., Tavert, G., Teycheney, P. Y., Ravelonandro, M., Candresse, T., and Dunez, J. 1990. Dot hybridization detection of plum pox virus using 32P-labelled RNA probes representing non-structured viral protein genes. J. of Virol. Methods 30:161-172.